

Papierchromatographische,
quantitative meso-Inositbestimmung
im Liquor cerebrospinalis

von

MATHIAS P. SAAR

München 1960

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL

Papierchromatographische, quantitative meso-Inositbestimmung
im Liquor cerebrospinalis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Mathias P. Saar
aus
München

München 1960

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

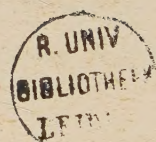
Referent: Prof. Dr. A. Bernsmeier

Correferent: Prof. Dr. Dr. Bodechtel

Dekan: Prof. Dr. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 60

Meinen Eltern gewidmet



Inhaltsangabe:

A. Einleitung

Geschichtlicher Überblick
Problemstellung

B. Methodik

Grundlagen der verwendeten Methode
Ausführung
Umrechnung der Ergebnisse auf mg %

C. Ergebnisse

Bei normalen Liquores
Bei pathologischen Liquores
Bei Meningitis tuberculosa

D. Diskussion

Fehlerrechnung
Deutung der Ergebnisse
Bedeutung für die Klinik
Ausblick

E. Zusammenfassung

F. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

Bei der Isolierung des Muskelkratins hat Scherer 1850 den Inosit entdeckt. Der Nachweis seiner Konfiguration wurde 1942 von Dangschat und Posternak erbracht. Der Inosit ist ein Hexaoxy-hexahydro-benzol. Trotz der Bruttoformel $C_6H_{12}O_6$ ist er kein Kohlenhydrat, sondern ein 6-wertiger, cyclischer Alkohol. Es existieren neun stereoisomere Formen, von denen der meso-Inosit, entsprechend seinem Vorkommen im Tier- und Pflanzenreich, die wichtigste darstellt. Die größte Inositquelle für den tierischen und pflanzlichen Organismus ist die Inositphosphorsäure und deren Calcium-Magnesiumsalz, das Phytin. Einen Beweis dafür, daß der Inosit am menschlichen Stoffwechselgeschehen beteiligt ist, hat wohl Starkenstein 1911 dadurch erbracht, daß er eine Phytase überall da fand, wo Inosit und Phosphorsäure nachgewiesen werden können. Trotzdem ist über die Biochemie dieses Stoffes, zumindest im deutschsprachigen Raum, wenig gearbeitet worden. Inosit ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. Er findet sich in freier Form und als Phytin. Schulzer gelang 1863 der Nachweis in Hirntumoren, Cloetta 1886 im Harn bei Morbus Bright. 1916 erkannte Momose den Inosit als Bestandteil der normalen Hirnsubstanz. 1941 konnte ihn Williams in nahezu allen menschlichen Organen und in der Muskulatur nachweisen. 1942 fanden Folch und Woolley Inosit als Baustein eines Phosphatids. Sonne und Sobotka bestimmten den Inositgehalt im normalen Plasma. 1945 erbrachten Johnson, Mitschel und Hamilton den Nachweis von Inosit im Schweiß.

Ein Vergleich des Inositgehaltes in den verschiedenen Kör-

perbestandteilen zeigt, daß das Gehirn weitaus am meisten Inosit enthält. Diese Tatsache kann sicher in Relation gebracht werden mit der Erkenntnis, daß der Inositgehalt bei jungen, wachsenden Organen und bei Tumoren (Starkenstein) sehr groß ist; also überall dort, wo viel Sauerstoff verarbeitet wird.

Neben der Eigenschaft des Inosits als Baustein im Organismus kommt ihm eine große Bedeutung als Wuchsstoff zu. Robinson und Woolley und andere amerikanische Forscher ordneten den Inosit in die Gruppe der B-Vitamine ein. Nach dem bisherigen Wissen besteht der Wirkungsmechanismus des Inosits als Vitamin darin, daß er als Coferment der Dehydrogenasen bei verschiedenen Stoffwechselprozessen eingreift. Bis jetzt sind zwar keine sicheren Inositmangelerscheinungen beim Menschen bekannt - der Inosit wird ja in der Nahrung reichlich angeboten - aber bei Mäusen und Ratten z. B. entstehen beim Fehlen von Inosit in der Diät Wachstumsstillstand, Haarausfall und Dermatitis (Woolley).

1957 warf Baumgarten die Frage auf, in wie weit sich der Inositgehalt der Organe und Körperflüssigkeiten diagnostisch verwerten läßt. Er richtete das Interesse in erster Linie auf jene Organe, die durch einen besonders hohen Gehalt an Inosit ausgezeichnet sind, also auf das Zentralnervensystem. Es wäre denkbar, daß Prozesse, die den Inositgehalt der Hirnsubstanz beeinflussen und sich in Liquornähe abspielen, auch den Liquorinositgehalt verändern.

Das Problem der vorliegenden Arbeit lautet also: Wie hoch ist

der Inositgehalt des Liquor cerebrospinalis beim Gesunden und bei verschiedenen Erkrankungen im Bereich des Zentralnervensystems?

Besonderes Interesse finden Fälle von Hirntumoren und Meningitis tuberculosa. Baumgarten (3) vermutete nämlich, daß Tumore, die ja einen besonders hohen Inositgehalt haben, Inosit an den Liquor abgeben. Der Liquorinositspiegel wäre dann erhöht und ließe diagnostische Schlüsse zu. Die Untersuchung des Liquorinosits bei tuberkulösen und anderen entzündlichen Erkrankungen, also vor allem bei Meningitis, hatte aus mehreren Gründen besonderes Interesse. Es ist bekannt, daß Inosit für Mikroorganismen ein unentbehrlicher Wachstoffsstoff ist. Deshalb könnte bei Anwesenheit von Bakterien im Liquor der Inositgehalt vermindert sein. Das gilt im besonderen Maße für Tuberkelbazillen, weil diese den Inosit nicht nur als Wachstoffs- sondern auch als Baustoff benötigen. Anderson konnte nämlich 1930 Inosit in deren Hüllsubstanz nachweisen.

Schließlich soll in dieser Arbeit auf den von Baumgarten gegebenen Grundlagen eine spezifische Methode der Inositbestimmung ausgearbeitet werden, die - falls die Voraussetzungen geschaffen werden - für diagnostische Zwecke geeignet sein könnte. Die bisher in der Liquorinositbestimmung verwendete mikrobiologische Methode ist zu kostspielig und zeitraubend und eignet sich daher wohl kaum für die Verwendung in der Klinik.

B. Methodik

Auf Anregung von F. Baumgarten habe ich zur quantitativen Inositbestimmung die Papierchromatographie mit anschließender Elution gewählt. Obwohl die Papierchromatographie hauptsächlich bei der qualitativen Analyse angewendet wird (15), gelingt in diesem Fall die quantitative Auswertung, weil der Inosit sehr gut wasserlöslich ist. Er läßt sich daher leicht vom Chromatogramm eluieren. Außerdem hat diese Methode gegenüber der bakteriologischen Bestimmung (9, 13) - deren Anwendungshäufigkeit vor allem durch die Tatsache eingeschränkt wird, daß nur der bakteriologisch Geschulte sich ihrer erfolgreich bedienen kann - den Vorteil, daß sie mit einem relativ geringen Aufwand verbunden ist. Allerdings ist zu sagen, daß - bei den geringen Inositmengen, die oft nur wenige Gamma betragen - die Grenze der Leistungsfähigkeit der quantitativen Papierchromatographie erreicht ist. Peinlich genaues Arbeiten ist daher für diesen Verwendungszweck Voraussetzung.

Den Weg der quantitativen Papierchromatographie gingen bereits H. Sulser und O. Högl (21) und P. Böhm und G. Richarz (5). Sulser isolierte chromatographisch den Inosit aus Phosphatidpräparaten. Er photographierte die Flecke auf Diapositive, wo er ihre Ausdehnung und Farbintensität mit einem Spektrallinien-Photometer maß. Dieser zeitraubenden und kostspieligen Methode haftet eine vom Autor angegebene Unsicherheit an, die nur durch wiederholte Bestimmungen ausgeglichen werden kann. P. Böhm und G. Richarz isolierten den Inosit chromatographisch aus Hirnphosphatiden. Der Inosit wurde aus den Chromatogrammen eluiert und oxydativ

mittels Perjodsäure bei 50° gespalten und der Perjodsäureüberschuß jodometrisch bestimmt.

Für die vorliegende Arbeit wurde diese Methode speziell für den Liquorinosit modifiziert. Im Laufe der methodischen Entwicklungsarbeit hat sich folgendes Verfahren - das schon Baumgarten für die Untersuchungen von Liquorinosit verwandte - als brauchbar erwiesen:

Man nimmt 6 ml Liquor, gibt 12 ml absoluten Alkohol zur Enteiweißung hinzu und zentrifugiert nach ca. 20 Minuten das koagulierte Eiweiß 15 Minuten lang bei einer Drehzahl von 5 - 6000 in der Minute ab. Da man nicht alle 18 ml aus dem Zentrifugenglas herauspipettieren kann, engt man nur 14 ml dieses enteiweißten Liquor-Alkohol-Gemisches im Vakuum bei höchstens 30° C bis zur Trockene ein. Den kristallinen Rückstand nimmt man mit 2 ml aqua bidest auf. Hat man nur 3 ml Liquor zur Verfügung, so enteiweißt man mit 6 ml absolutem Alkohol, engt 7 ml Liquor-Alkohol-Gemisch ein und nimmt mit 1 ml aqua bidest auf. Man kann also von jeder - allerdings nicht zu kleinen - Menge Liquor ausgehen, nur muß das Verhältnis der einzelnen Substanzen zueinander gleich bleiben. Als Minimalmenge für eine quantitative Inositbestimmung braucht man 2 ml Liquor.

Von einem so vorbehandelten Liquor trägt man mittels einer Zuckerpipette 0,1 ml auf die Startlinie des Chromatogrammes unter warmen Föhn auf. Man hält den Fleck möglichst klein und arbeitet rasch, damit keine Vergärung oder sonstige Denaturierung eintritt.

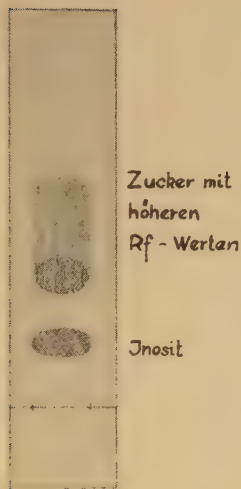


Abb. 1

Dieses Verfahren führt zu brauchbaren Chromatogrammen, d. h. der Inositfleck kommt scharf begrenzt heraus und ist weit genug von den anderen Flecken entfernt. (siehe Abb. 1)

Hat man nun eine bestimmte Menge Inosit gefunden, so folgt die Umrechnung auf mg %. Die anschließend wiedergegebenen Überlegungen mögen den Gang der Rechnung darlegen:

Man findet z. B. 5 ‰. Diese 5 ‰ waren in den 0,1 ml des schließlichen und chromatographierten Aufarbeitungsproduktes des Liquors enthalten. Wurde der Rückstand nach der Einengung mit 2 ml aqua bidest aufgenommen, so sind in diesen 2 ml $\frac{2}{0,1} \cdot 5 \text{ ‰} = 100 \text{ ‰}$ Inosit enthalten. In den 14 ml Liquor-Alkohol-Gemisches, das bis zur Trockene eingeengt wurde, waren natürlich gleichfalls 100 ‰ Inosit enthalten. Von diesem Gemisch sind $\frac{14}{3}$ ml Liquor. In 1 ml Liquor sind demnach

100 : $\frac{14}{3}$ = 21,42 % Inosit. In 100 ml Liquor sind 2142 % = 2,142 mg Inosit. Dieser Liquor enthielte also 2,142 mg % Inosit. Diese Überlegungen faßte ich mathematisch zu folgender Formel zusammen:

a = gefundener Inosit in %

b = ml aqua bidest, mit dem der Rückstand aufgenommen wurde

$$\frac{a \cdot 0,3 \cdot b}{c \cdot d} = x \text{ mg \%}$$

c = ml Liquor-Alkohol-Gemisch

d = ml vorbehandelten Liquor, der aufgetragen wurde.

Zweckmäßigerweise geht man immer von der gleichen Liquormenge aus. Dann schmilzt die Formel zu einer Konstanten zusammen, mit der man die gefundenen Gamma einfach multipliziert. Jeder einzelne Liquor wurde vier- bis sechsmal analysiert und davon der Mittelwert genommen.

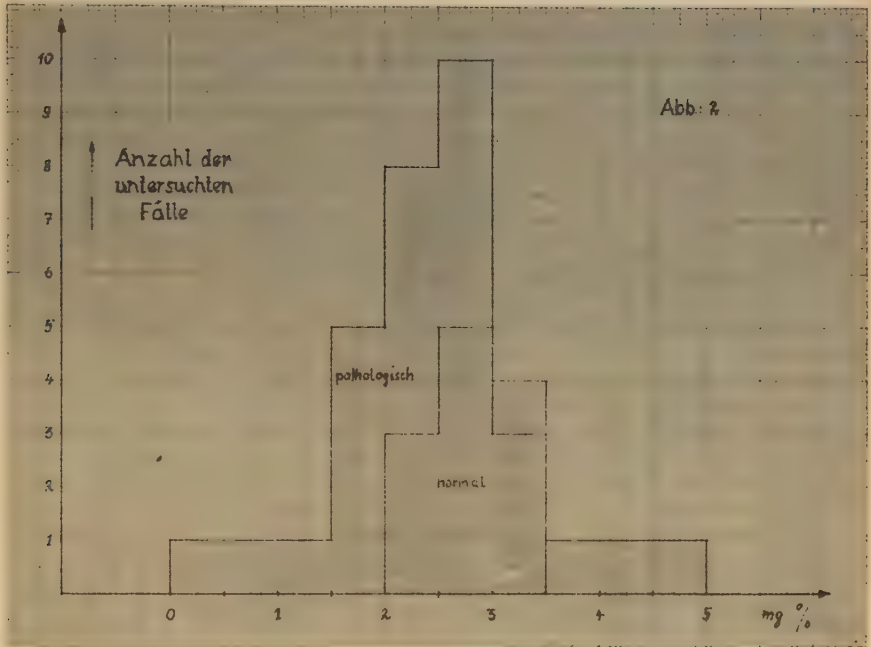
Die Liquoranalysen der pathologischen Fälle führten zu folgenden Ergebnissen:

Diagnose	Einzelmessungen						Mittelwert	mg % Inosit
Meningitis epidemica	1,5	1,8	0,9	0,0	0,0	0,4	1,1	0,3
Encephalitis epid.	2,0	0,25	2,5	2,75			1,87	0,8
Hirnatrophie, senil	1,5	3,5	1,75				2,3	1,4
genuine Epilepsie	8,3	8,5	3,0	3,0			5,4	1,62
Bandscheibenprol. lumb.	2,0	3,6	2,8				2,8	1,68
Parkinson, arterioskl.	3,75	4,0	4,25	3,75			3,94	1,70
Hirnatrophie,luet.	7,25	12,1	12,3	8,25			9,9	1,90
Multiple Sklerose	4,0	3,75	6,4				4,73	2,04
Bandscheibenprol. cervic.	8,5	11,75	12,0	9,75			10,2	2,05
Glioblastom	7,0	5,25	5,0	4,0	3,75	4,25	4,9	2,10
Halsmark-prozeß	5,2	5,4	6,0	11,8			7,1	2,10

Diagnose	Einzelmessungen						Mittelwert	mg % Inosit
cerebr. Arteriosklerose	6,8	7,1	8,7				7,2	2,16
Diabetes insipidus	6,0	4,5	5,25	5,25	6,0	5,25	5,4	2,31
leichte Hirnatrophie	7,0	4,5	5,2	5,0	3,0	8,3	5,5	2,35
genuine Epilepsie	7,2	4,8	4,5				5,5	2,36
Psychopathie	10,0	13,7	15,0				12,7	2,50
Cerebral- sklerose	6,0	5,5	7,25				6,25	2,68
Epilepsie posttraumatisch	8,0	7,25	5,0	5,25			6,4	2,73
genuine Epilepsie	5,0	5,25	5,5	9,75			6,37	2,73
Bandscheiben- prol. lumb.	6,5	6,25					6,38	2,74
Dämmerzustand epilept.	11,0	9,7	7,7				9,4	2,80
Bandscheiben- prol. lumb.	8,2	8,3	8,5	13,4			9,6	2,80
cerebr. Gefäßprozeß	6,75	6,0	6,75	6,75			6,56	2,82

Diagnose	Einzelmessungen						Mittelwert	mg % Inosit
Bandscheibenprol. lumb.	9,8	9,8					9,8	2,90
Neurolues	8,5	10,0	11,1	11,1			10,1	3,00
inkompl. Querschnitt, traumat.	9,0	7,5	7,5	7,8	7,5	11,7	8,5	3,08
Cerebralsklerose	10,6	11,2	11,3				11,0	5,30
Epilepsie genuin	5,3	4,0	7,7	6,5			5,6	3,35
Ventricelerweiterung, posttraum.	8,0	8,5	10,5	11,25			9,55	3,86
Lues latens	11,5	15,5	11,4	15,0	15,8		13,8	4,15
Halsmark-tumor	9,5	7,75	8,25	6,75			8,06	4,80
<u>Mittelwert: 2,6 mg %</u>								

Die folgende graphische Darstellung zeigt die Verteilungshäufigkeit der normalen und der pathologischen Liquoranalysen:



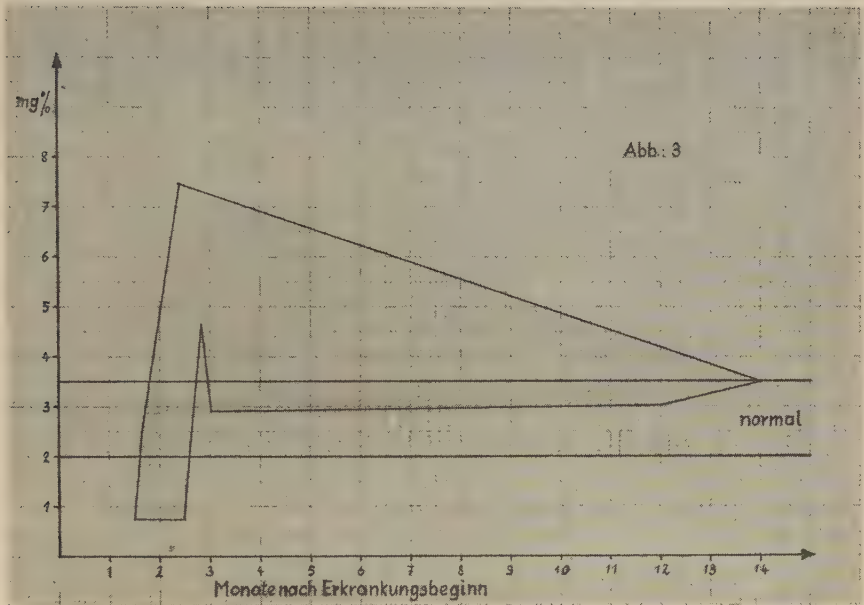
Aus der Darstellung geht hervor, daß sowohl bei den normalen als auch bei den untersuchten pathologischen Liquores das Verteilungshäufigkeitsmaximum bezüglich des Inositgehaltes zwischen 2,5 und 3,0 mg % liegt.

Ferner wurden Liquores von tuberkulösen Meningitiden untersucht. Hier waren die ersten Ergebnisse sehr uneinheitlich; die Werte lagen entweder unter oder über der Norm. Erst die regelmäßige Verfolgung des Inositgehaltes im Verlauf der

Erkrankung brachte eine Gesetzmäßigkeit zu Tage, die recht interessant und teilweise überraschend ist. Es zeigte sich, daß der Inositgehalt von der Erkrankungsdauer abhängig ist. Im einzelnen kam es zu folgenden Ergebnissen:

Liquorinosit-Analysen nach Erkrankungsbeginn im	I	II	III	IV	V	VI
1. Monat						
2. Monat	0,82 2,9		2,5 2,2		0,83	3,1 2,5 3,7
3. Monat	3,3 5,0		3,1 4,2 5,2 6,1 7,4 5,2		5,0+	3,4 4,05 3,4 2,0
4. Monat			2,9			
5. Monat						
6. Monat						
7. Monat						
8. Monat						
9. Monat						
10. Monat						
11. Monat		3,6				
12. Monat		3,0				
13. Monat				3,6		

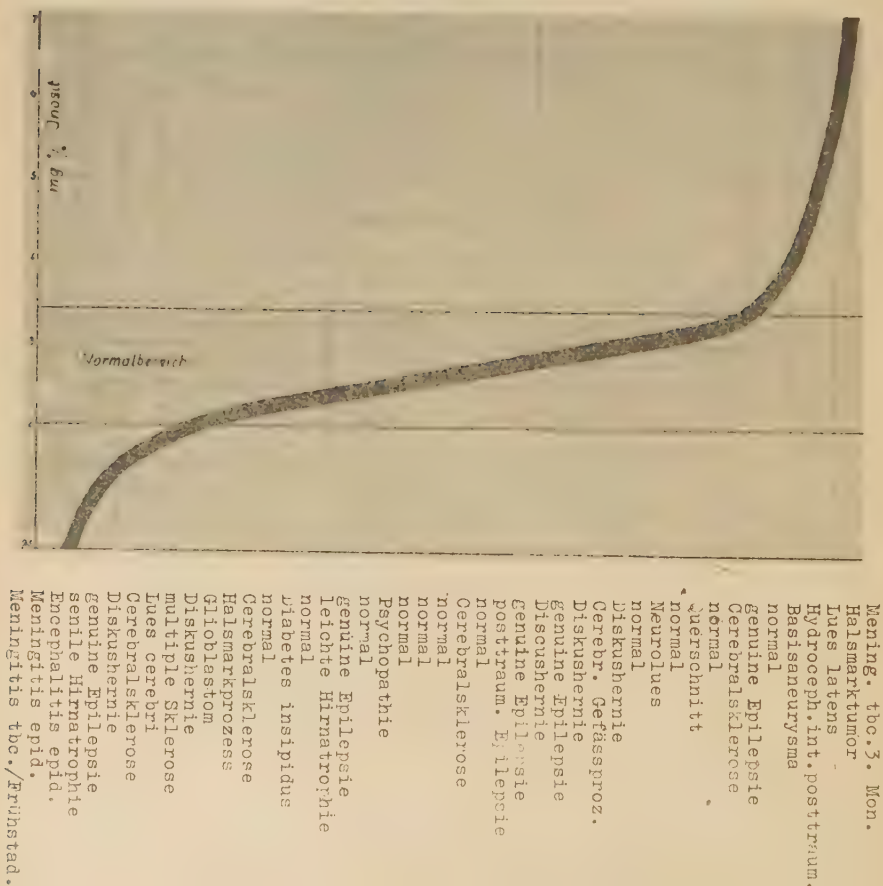
Die folgende graphische Darstellung kam dadurch zustande, daß alle Inositspiegelkurven, die sich im Verlaufe der Erkrankung ergaben, aufeinander projiziert wurden:



Es zeigte sich, daß zu Beginn der Erkrankung der Inositspiegel deutlich unter der untersten Grenze des Normalbereiches liegt. Während der tuberculostatischen Behandlung mit Neoteben und Streptomycin - der Liquor wurde jeweils vor den Medikamenteninstallationen, nie kurz danach, entnommen, so daß eine unmittelbare Störung der Analysenergebnisse durch ein intrathekal gegebenes Tuberculostaticum ausgeschlossen ist - schnellte er im zweiten bis dritten Monat in die Höhe, übersteigt den Normalbereich und erreicht im Laufe des dritten Monats einen Gipfel. Eine erwachsene Patientin starb zu diesem Zeitpunkt, die anderen fünf Kinder überstanden die Krankheit. Nach Erreichung dieser Maximalwerte beginnt der Inositspiegel wieder zu sinken und erreicht bei einem Patienten bereits im dritten, bei zwei weiteren spätestens im dreizehnten Monat nach Erkrankungsbeginn den Normalbereich. Ein Kind bekam im dritten Monat - also zu

dem Zeitpunkt, an dem der Inosit Spiegel seinen Maximalstand erreicht hatte - wohl infolge der häufigen Medikamentinstillationen eine sekundäre Streptokokkeninfektion dazu. Daraufhin sank der Liquorinosit sogleich auf normale Werte ab.

Die folgende graphische Darstellung gibt einen Überblick über alle Ergebnisse in dieser Arbeit:



Aus der Darstellung ist ersichtlich, daß viele Erkrankungen, bei denen hier der Liquor untersucht wurde, den Liquorinosit nicht pathologisch beeinflussen. Eine auffällige Veränderung im Sinne einer Inositverminderung besteht bei Meningitis epidemica, Encephalitis epidemica, Meningitis tuberculosa im Frühstadium, seniler Hirnatrophie, genuiner Epilepsie, Bandscheibenprol. lumb., Arteriosklerose undluet. Hirnatrophie. Eine Inositvermehrung ist zu beobachten bei Lues latens, Halsmarktumor, posttraum. Ventrikelerweiterung und Meningitis tuberculosa im 3. Monat.

D. Diskussion

Abgesehen von den mikrobiologischen Methoden war an der Spezifität der verschiedenen Inositbestimmungsverfahren seit jeher zu zweifeln. Für unsere papierchromatographische Methode konnten wir sicherstellen, daß von gleichfalls mit Perjodsäure reagierenden Verbindungen - die im Liquor enthalten sein könnten - nur die Lactose einen ähnlichen Rf-Wert hat wie Inosit. Lactose kommt aber im Liquor nicht in erfaßbaren Mengen vor. Man könnte ferner einwenden, daß gebundener, z. B. phosphorylierter Inosit zusammen mit dem freien Inosit erfaßt würde. Ist es bereits sehr unwahrscheinlich, daß solch ein verändertes Molekül denselben Rf-Wert hat wie freier m-Inosit, so spricht für die Spezifität unserer Methode, daß wir dieselben Inositwerte in normalen Liquores fanden, wie andere Autoren (Herken und Nixon) mit spezifischen mikrobiologischen Verfahren.

Um eine Aussage über die Größe der Fehler dieser Methode machen zu können, wurden 17 Modellanalysen durchgeführt. Es wurden bestimmte Mengen Inosit papierchromatographiert, eluiert und jodometrisch bestimmt. Die gefundenen Mengen seien in Prozent der aufgetragenen Mengen aufgezählt:

104,6 %; 98,0 %; 113,8 %; 98,1 %; 93,1 %; 98,4 %; 84,0 %; 102,6 %; 98,8 %; 107,7 %; 99,1 %; 87,9 %; 86,2 %; 91,0 %; 93,3 %; 96,5 %; 96,2 %; der Mittelwert beträgt 97,0 %; es gehen also durchschnittlich 3 % der Einwaage verloren. Die Inositverluste bei der Aufarbeitung sind also tragbar, der methodische Fehler ist hinreichend klein. Es zeigte sich ferner, daß der günstigste Meßbereich zwischen 60 % und 70 % liegt.

Bei Liquoranalysen ist die Fehlerbreite leider häufig wesentlich größer. Es kamen gelegentlich bei den 4 - 6 Einzelmessungen einer Analyse Abweichungen zweier Werte von 50 % und mehr vor. Woran das im einzelnen liegt, ist nicht ganz klar. Die Elution konnte immer gut ausgeführt werden, weil durch das beschriebene Vorbehandlungsverfahren der Inositfleck scharf begrenzt und von anderen Substanzen gut getrennt war. Wahrscheinlich ist die Beeinträchtigung der scharfen papierchromatischen Abtrennung des Inosits durch außerdem im Liquor enthaltenen Substanzen die Ursache dieser größeren Fehler. Um diese Fehler auszuschalten, haben wir auch Versuche mit der elektrolytischen Entsalzung gemacht. Es liegt aber auf der Hand, daß alle zusätzlichen Reinigungsmanipulationen auch weitere Fehlerquellen in sich bergen und somit möglichst zu meiden sind, so bald es auf quantitative Aussagen ankommt. Daß durch Übung der Methode die Fehlerbreite herabsetzbar ist, zeigt die Tatsache, daß die letzten Analysenergebnisse viel besser waren als die ersten. Insgesamt wurden 270 Einzelmessungen durchgeführt, so daß schließlich jeder einzelne Handgriff, jede Schüttelbewegung bei der Elution usw. immer gleichartig ausgeführt wurde.

Um brauchbare Werte zu erzielen, wurden - wie berichtet - mindestens vier Einzelmessungen bei jeder Liquoranalyse vorgenommen. Da sehr leicht mehrere Messungen gleichzeitig ohne wesentlichen Mehraufwand an Zeit und Arbeit ausgeführt werden können, war das leicht möglich. Obwohl nun die Einzelmessungen einer Analyse manchmal stark voneinander abweichen, ist der daraus resultierende Mittelwert überraschend gut.

Die Brauchbarkeit der in dieser Arbeit ermittelten Analysenergebnisse, die - wie gesagt - Mittelwerte von 4 - 6 Einzelmessungen sind, kann auf folgende Weise gezeigt werden: Der normale Liquorinositgehalt ist von Herken und Nixon unabhängig voneinander mikrobiologisch zu 2,7 mg % bestimmt worden. Da die mikrobiologische Methode wohl als die exakteste bezeichnet werden muß, ist dieses Ergebnis stichhaltig. Wenn ich nun für meine Normalliquor-Analysen die Fehlerbreite bestimme und mit dem Ergebnis von Herken und Nixon vergleiche, kann ich angeben, wie nahe ich mit der relativ einfachen papierchromatographischen Methode an die sehr genaue mikrobiologische herankomme:

mg %	1	1 ²
2,25	- 0,45	0,20
2,34	- 0,36	0,13
2,40	- 0,30	0,09
2,50	- 0,20	0,04
2,57	- 0,13	0,02
2,60	- 0,10	0,01
2,70	0	0
2,93	+ 0,23	0,05
3,05	+ 0,35	0,13
3,12	+ 0,42	0,18
3,44	+ 0,74	0,55
Mittelwert: 2,7	Summe [1] = + 0,20	Summe [11] = 1,40

In der ersten Kolonne stehen die gemessenen Analysenwerte. In der zweiten Kolonne sind die mit 1 bezeichneten Abwei-

chungen vom arithmetischen Mittelwert aufgeführt. In der dritten Kolonne sind die Quadrate der Abweichungen notiert.

Der mittlere Fehler m des einzelnen Analysenergebnisses oder die Dispersion stellt sich folgendermaßen dar:

$$m = \pm \sqrt{\frac{[11] - \frac{[1]^2}{n}}{n - 1}} = \pm \sqrt{\frac{1,40 - \frac{0,04}{11}}{10}} = \pm 0,37$$

Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist

$$M = \pm \frac{m}{\sqrt{n}} = \pm \frac{0,37}{\sqrt{11}} = \pm 0,11$$

Da mehr als $2/3$ der Fehler kleiner sind als die berechnete Dispersion, darf die Meßreihe als einwandfrei bezeichnet werden.

Der normale Liquorinositspiegel beträgt also - papierchromatographisch bestimmt - $2,7 \pm 0,11$ mg % und stimmt mit den oben zitierten, mikrobiologischen Ergebnissen gut überein.

Inositvermehrungen über 3,4 mg % und -verminderungen unter 2 mg % sind signifikant pathologisch, weil von da ab die Differenz zum Normalwert größer ist als der dreifache mittlere Fehler des Mittelwertes (3 σ).

Aus diesen Betrachtungen ist ersichtlich, daß mit der relativ

einfachen papierchromatographischen Methode befriedigende Ergebnisse erzielt werden können.

Wie sind nun die Ergebnisse der Liquorinosit-Analysen zu deuten?

Der Inositgehalt der normalen Liquores wurde im Bereich von 2,0 - 3,4 mg % ermittelt. Da der gefundene Mittelwert von 2,7 mg % mit den Mittelwerten von Herken und Nixon übereinstimmt, die bei diesen Autoren mit Hilfe der mikrobiologischen Methode zustande kamen, darf er als biologische Konstante angesehen werden. Auffallend ist, daß der Inositgehalt im Liquor dreimal so hoch ist wie im Serum (Herken und Nixon). Der Inosit kann demnach nicht allein durch einen einfachen Diffusionsvorgang vom Serum über die Blut-Liquor-Schranke in den Liquor gelangen, sondern er muß aus dem besonders inositreichen Cytoplasma der Hirnzellen an den Liquor abgegeben werden. Die Aufrechterhaltung des gegenüber dem Blut wesentlich höheren Inositgehaltes im Liquor ist nur vorstellbar, wenn die Diffusion von Liquorinosit ins Blut im Sinne einer Liquor-Blut-Schranke gehemmt ist und wenn ständig reichlich Inosit aus dem ZNS-Gewebe nachgeliefert wird. Ferner ist aus der Tatsache des hohen Inositgehaltes im Liquor zu schließen, daß der Liquor nicht allein durch Ausscheidung aus den plexus chorioidei gebildet werden kann, denn sonst könnte sein Inositgehalt nicht höher sein als der des Blutes; sondern daß er vielmehr auch Anteile aus der Gewebsflüssigkeit des ZNS enthält. Darüber hinaus kann man auf Grund der bisherigen Untersuchung dieser Frage nichts weiteres über das Zustandekommen des außerordentlich hohen Inositgehaltes im Liquor sagen. Selbst Herken, der - auch mit Hilfe radioak-

tiver Isotopen - schon viele neue Erkenntnisse über den Inositstoffwechsel des ZNS erbrachte, sagt:

"Die biochemischen Vorgänge, die zur Anreicherung des m-Inosits im ZNS führen, sind noch nicht bekannt. Auch ist es nicht gelungen festzustellen, welche Bedeutung die beträchtlichen Mengen dieses Cyclits für die Hirnfunktion haben", und an anderer Stelle "Der Umsatz erheblicher Mengen von Inosit im Stoffwechsel des Gehirngewebes und der hohe Gehalt des normalen Liquors sprechen dafür, daß der m-Inosit im intermediären Stoffwechsel des ZNS eine beträchtliche Rolle spielt." Für die Annahme, daß der Liquorinosit aus der Hirnzelle stammt, spricht auch eine Beobachtung von Nixon. Er meint, daß der Inositgehalt im Liquor nach dem Tode deshalb stark ansteigt (auf maximal 72 mg %), weil die Anreicherung von m-Inosit im Cytoplasma der Hirnzelle durch einen Stoffwechselprozeß erfolgt, der nach dem Tode aufhört, so daß der Inosit dann, da er nicht verbraucht wird, in die Umgebung abwandert.

Auf Vorstellungen von Baumgarten (3) fußend, erklären wir uns das postmortale Ansteigen des Liquorinosits ähnlich, wie man es sich bei liquornahen Tumoren vorstellen kann: Durch Abbau und in diesem Falle durch Autolyse inosithaltigen Hirngewebes. Dieser Mechanismus erscheint uns wahrscheinlicher, da post mortem die Zirkulation des ohnehin sehr inositarmen Blutes ruht, so daß von hier aus keine Inositanreicherung im ZNS infolge aktiver Stoffwechselprozesse erfolgen kann.

Die Inositverminderung bei seniler Hirnatrophie auf 1,4 mg %, bei einer cerebralen Arteriosklerose mit dem klinischen Bild

des Parkinsonismus auf 1,7 mg % und beiluetischer Hirnatrophie auf 1,9 mg % ist so erklärbar, daß dabei sämtliche cerebralen Stoffwechselvorgänge reduziert sind und das Gehirn in seiner Substanz vermindert ist. Es ist also auch zu vermuten, daß die spezifische Stoffwechselfunktion der Hirnzellen, den Inosit anzureichern und den normalen Liquorinositspiegel aufrecht zu erhalten, eingeschränkt ist. Die Folge davon wäre eine Verminderung des Inosits im Liquor. Zu bemerken ist, daß bei einem Patienten mit geringfügiger arteriosklerotischer Hirnatrophie der Inositgehalt des Liquors noch normal war. Auch bei drei leichteren Fällen von Cerebralsklerose zeigte sich keine Inositveränderung im Liquor.

Eine auffallend starke Liquorinositverminderung - meistens unter 1 mg % - trat bei den entzündlichen Vorgängen im Bereich des Zentralnervensystems zu Tage, nämlich bei Encephalitis epidemica, Meningitis epidemica, Meningitis tuberculosa in den ersten beiden Monaten nach Erkrankungsbeginn und bei einer Streptokokkeninfektion. Wir sehen zwei Erklärungsmöglichkeiten hierfür: Erstens wäre denkbar, daß durch die entzündlichen Prozesse die Liquor-Blut-Schranke für Inosit herabgesetzt wird, so daß in gesteigertem Maße Inosit aus dem Liquor in das wesentlich inositärmere Blut diffundiert. Eine zweite Möglichkeit liegt darin, daß der Inosit für Mikroorganismen, also für die Erreger dieser Erkrankungen, ein Wuchsstoff ist und von diesen verbraucht wird. Es wäre ^{also} aber möglich, daß die Erreger mehr Inosit verbrauchen als vom Cytoplasma nachgeliefert wird. Bei der spezifischen Meningitis tuberculosa kommt noch hinzu, daß Inosit reichlich in die Hüllsubstanz des Tuberkelbazillus einge-

baut wird (Anderson). Außerdem ist die Vermutung, daß bei diesen Affektionen der Inositstoffwechsel durch toxische Stoffe der Erreger gehemmt wird und daß es dadurch nicht mehr in vollem Maße zu der physiologischen Inositanreicherung im ZNS kommt, nicht von der Hand zu weisen.

Bei diesen Fällen stimmen die Ergebnisse mit den Erwartungen von Baumgarten voll überein. Für die Diagnostik der Meningitiden scheint also die Inositbestimmung Bedeutung zu haben. Wenn es durch weitere Untersuchungen gelingt, diese Beobachtungen zu bestätigen, so hat man bei klinisch ungenauen Anhaltspunkten für eine Meningitis eine ziemlich sichere diagnostische Labormethode. Über die jeweiligen Erreger der Meningitiden kann nach den bisherigen Erfahrungen auf Grund des Liquorinosits noch nichts ausgesagt werden.

Die Inositverminderungen bei genuiner Epilepsie lassen sich ähnlich erklären wie bei anderen hirnatrophischen Prozessen.

Analysen bei fünf Fällen von Bandscheibenprolaps zeigten nur einmal eine deutliche Erniedrigung des Liquorinosits. Bei vier Fällen war der Inositgehalt normal. Für diese Beobachtung haben wir noch keine Erklärung.

Aus den Tabellen über die Analysenergebnisse ist ersichtlich, daß viele pathologische Vorgänge im Bereich des Zentralnervensystems den Inositgehalt im Liquor nicht beeinflussen. Bemerkenswert ist, daß die Analysenwerte bei Multipler Sklerose, Querschnittslähmung durch Wirbelfraktur, posttraumatischer Epilepsie und Diabetes insipidus normal waren.

In der Abbildung 2 sieht man bei der Darstellung der pathologischen Liquores eine Linksverschiebung der Meßwerte in den Bereich geringerer Inositzkonzentration. D. h., daß bei den untersuchten pathologischen Liquores im ganzen gesehen eine gewisse Tendenz zur Inositverminderung besteht, was auch aus dem geringeren Mittelwert von 2,6 mg % ersichtlich ist. Es zeigte sich - von den Tuberkulosefällen abgesehen, die gesondert behandelt werden - nur bei vier Liquores eine Inositvermehrung. Und zwar war der Inositgehalt bei einer posttraumatischen Ventrikelerweiterung auf 3,9 mg % bei Lues latens auf 4,2 mg %, bei einem Halsmarktumor auf 4,8 mg % und bei einem Liquor, der im Anschluß an eine Operation zur Beseitigung eines Hydrocephalus - hervorgerufen durch eine Meningitis tuberculosa - abgenommen wurde, auf 6,1 mg % erhöht. Eine solche Inositvermehrung könnte man so erklären, daß entweder vom Cytoplasma der Gehirnzelle mehr Inosit an den Liquor abgegeben wird, oder daß vom Liquor mehr Inosit aufgenommen als an das Blut abgegeben wird. Bei dem genannten Trauma und bei der Hirnoperation könnte durch die mechanische Schädigung der inositreiche Zellinhalt in gewisser Analogie zu den oben diskutierten postmortalen Veränderungen in den Liquor übergegangen sein und so den Inositanstieg bewirkt haben.

Die Ursache für die Inositvermehrung bei Lues latens könnte in pathologischen Veränderungen von biochemischen Vorgängen im ZNS gefunden werden. Es könnte entweder die Abgabebereitschaft für Inosit erhöht sein, oder es könnte das Rückkopplungsprinzip - das ja bei allen physiologischen Regulationsmechanismen besteht - gestört sein, so daß bei

Überschreitung des Normalspiegels eine weitere Inositabgabe nicht verhindert wird.

Die Inositerhöhung bei einem Halsmarkttumor kann - wie anfangs in der Problemstellung gezeigt - erklärt werden: Der Tumor ist sehr inositreich und gibt Inosit an den Liquor ab. Warum kommt es aber - wie ermittelt - beim Vorhandensein eines Glioblastoms zu keiner Inositvermehrung? Diese beiden gegensätzlichen Aussagen beleuchten die Schwierigkeit dieses Problems. Erst weitere Materialsammlungen werden endgültige Schlüsse zulassen. Jedenfalls wird darauf zu achten sein, wie sich der Tumor räumlich zum Liquor verhält, ob seine Zellverbände und seine Zellen zerfallen und von welcher Matrix er abstammt. Es wäre denkbar, daß ein nicht zerfallendes Neoplasma gar keinen Inosit abgibt, weil es durch seine autonome Stellung im Organismus gar keine physiologische Beziehung zum Liquor hat. Zu dem wird bei allen derartigen Untersuchungen darauf zu achten sein, an welcher Stelle der Liquor entnommen wurde, z. B. durch Suboccipital- oder Lumbalpunktion, und wie die räumlichen Verhältnisse der Punktionsstelle zum pathologischen Prozeß sind. Da die untersuchten Liquores aus verschiedenen Kliniken (Krankenhaus r.d. Isar, Univ. Kinderklinik, Univ. Nervenklinik, Chir. Univ. Klinik, II. Medizinische Klinik) stammen, waren die Verhältnisse nicht für jeden einzelnen Fall zu ermitteln. Es müßte ferner untersucht werden, wie sich grundsätzlich der Ventrikelliquor zum Suboccipital- und Lumballiquor hinsichtlich seiner Inositwerte bei ein und derselben Person verhält. Diese Frage ergab bekanntlich bei Untersuchung des "Liquorzuckers" interessante Aufschlüsse.

Bemerkenswert ist ferner der von uns erstmalig beobachtete wechselhafte Verlauf des Liquorinositgehaltes bei Meningitis tuberculosa. Die zu Beginn der Erkrankung bestehende Inositverminderung ließe sich - wie schon gesagt - dadurch erklären, daß die Liquor-Blut-Schranke erniedrigt wäre und daß die virulenten Tuberkelbazillen den Inosit sowohl als Wuchs- als auch als Baustoff verbrauchten. Für den Inositanstieg auf maximal 7,4 mg % im dritten Monat nach Erkrankungsbeginn kommen folgende Erklärungsmöglichkeiten in Betracht: Der Organismus versucht bekanntlich den für bisher weitgehend unbekannte Vorgänge benötigten Liquorinosit auf normaler Höhe zu halten. Bei ziemlich rascher Beseitigung der dies verhindernden Infektion durch Tuberculostatica könnte er dann über das physiologische Maß hinausschießen und sich erst später wieder normalisieren. Für die Veränderungen des Liquorinosits bei Meningitis tuberculosa können ferner Verklebungsprozesse der Meningen, Liquorzirkulationsstörungen und Veränderungen der Hirn-Liquor-sowie der Liquor-Blut-Schranke eine Rolle spielen, die im einzelnen noch unbekannt sind. Die endgültige Normalisierung des Liquors geht nach unseren bisherigen Erfahrungen verschieden schnell vor sich. Sie kann bereits im dritten Monat, aber auch erst im Laufe eines Jahres erfolgen. Der Grund dafür dürfte in dem von Fall zu Fall verschiedenen Krankheitsverlauf liegen. Bei noch erhöhtem Inositgehalt können bereits alle klinischen Symptome abgeklungen sein.

Ausblickend sei festgestellt, daß sich weitere Liquoranalysen - speziell bei Meningitiden und Tumoren - als fruchtbar erweisen dürften. Für die Klinik scheinen, jedenfalls, was die Meningitiden und die Encephalitiden anbelangt, die Grundlagen für die Entwicklung eines neuen diagnostischen Verfahrens gegeben zu sein.

E. Zusammenfassung

1. Es wird über eine neue, quantitative, papierchromatographische Bestimmungsmethode des Liquorinosits berichtet. Die Fehlergröße im Vergleich zu mikrobiologischen Methoden wird angegeben.
2. Mit diesem Verfahren wurde bei 70 Liquores von Gesunden und am ZNS Erkrankter der Inositgehalt bestimmt.
3. In den normalen Liquores wurden Inositwerte von 2 - 3,4 mg % gefunden.
4. Hervorgehoben sei, daß deutliche Erniedrigungen des Liquorinosits, vor allem im akuten Stadium von Meningitiden und Encephalitis epidemica, Erhöhungen im Spätstadium der Meningitis tuberculosa und weniger deutlich bei verschiedenen anderen Erkrankungen des ZNS, gefunden wurden.
5. Bei Meningitis tuberculosa wurde der Inositgehalt durch viele Monate der Erkrankung verfolgt. Nach primärem Absinken kam es zu einem Maximum bis zu 7,4 mg % Liquorinosit jeweils im dritten Monat der Erkrankung.
6. Für die Diagnostik und die Beurteilung des Krankheitsverlaufes der Meningitiden scheint die Inositbestimmung Bedeutung zu haben, denn bei den untersuchten Fällen zeigte sich jedesmal eine anfängliche signifikante Inositverminderung unter 1 mg %. Für die Beurteilung der Verhältnisse bei Tumoren und anderen Erkrankungen des ZNS ist das untersuchte Material noch zu klein.
7. Die Entstehungsweise der pathologischen Veränderungen des Inositgehaltes im Liquor cerebrospinalis wird diskutiert.

F. Literaturverzeichnis

- 1 Anderson, R.J. u. Roberts, E.G., J. biol. Chem., 89, 611 (1930)
- 2 Atkin, L., Schulz, A.S. u. Williams, W. L., Ind. Eng. Chem., Anal. Edr., 15, 141 (1943)
- 3 Baumgarten, F.
- 4 Beckmann, R. m-Inosit, Editio Cantor KG, Aulendorf (1953)
- 5 Böhm, P. u. Richarz, G., Hoppe-Seyler, Zs. f. phys. Chemie, Bd. 298 (1954)
- 6 Cloetta, A., J. pract. chem., 66, 211 (1855); Ann., 99 289 (1865)
- 7 Dangschat, G. u. Fischer, H.O.L., Naturwissensch., 30 146 (1942)
- 8 Folch, J., J. Biol. Chem., 177, 505 (1949); Federation Proc., 5, 134 (1946)
- 9 Herken, H. u. Maibauer, D., Klin.wSchr., 32, 1113 (1954)
- 10 Herken, H., Maibauer, D. u. Weygand, F., Naunyn-Schmiedeberg's Archiv f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 233, 4. Heft
- 11 Johnson, C. B., Mitchell, H.H. u. Hamilton, T.S., J. Biol. Chem., 161, 357 (1945)
- 12 Momose, G., Biochem. J., 10, 120 (1916)
- 13 Nixon, D.A., J. of Physiol., 119, 18 (1953); 129, 272 (1955) (London)
- 14 Posternak, T., Helv. Chim. Acta, 18, 1283 (1935); 25, 746 (1942)
- 15 Radhakrishnamurty, R., Chem. Abstr., 48, 3431 (1954)
- 16 Robinson, F., The Vitamin B-Complex. London, Chapman u. Hall, (1951)
- 17 Scherer, v., J., Annalen, 73, 322 (1850)
- 18 Schultzer, Arch. f. Anat. u. Phys., 1, 25, (1863)
- 19 Sonne, S. u. Sobotka, H., Arch. of Biochem., 14, 93 (1947)
- 20 Starkenstein, E., Biochem, Zeitschr., 30, 56 (1911)
- 21 Sulser, H. u. Högl, O., Mitt. Lebensm. u. Hyg., 44, 79 (1953)
- 22 Williams, R.J., Univ. Texas Publ., 1941, Nr. 4137, s. 27
- 23 Woolley, D.W., Biol. Symposia, 12, 279 (1947); C.A., 41, 5177 (1947); J. Biol. Chem., 136, 113 (1940); 139, 29 (1941); 140, 453 (1941); J. Exp. Med., 75, 277 (1942).

Herrn Professor Dr. Dr. G. Bodechtel möchte ich danken für sein Entgegenkommen, das es mir ermöglichte, in seiner Klinik die Experimente zur vorliegenden Arbeit auszuführen. Herrn Professor Dr. A. Bernsmeier danke ich für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. F. Baumgarten für die Einführung in die Problematik der Arbeit und für die zahlreichen Ratschläge und die Kritik bei der Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 20. Juli 1932 wurde ich als Sohn des Ehepaares Mathias und Betty Saar, geb. Heindl, in München geboren. Hier kam ich 1939 in die Volksschule. Nach der vierten Klasse trat ich in die Deutsche Heimschule Marquartstein ein. Meine Schulausbildung setzte ich nach Kriegsende an der Maria-Theresia-Oberrealschule in München fort. Dort machte ich 1952 das Abitur.

Anschließend studierte ich an der Universität München vier Semester Mathematik und Physik bis zum Vorexamen. 1954 beendete ich das naturwissenschaftliche Studium und immatrikulierte mich in der medizinischen Fakultät. Das Physikum bestand ich 1957 und beendete am 2. Juni 1960 mit dem Staatsexamen mein Medizinstudium.

